



مقایسه دو روش دیسک دیفیوژن و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در شناسایی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)

محسن رضازاده^۱، رسول یوسفی مشعوف^۲، حسین سرمیدان^۳، احسان اله غزنوی‌راد^{۴*}

^۱ گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

^۲ گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

^۳ گروه عفونی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

^۴ مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

(دریافت مقاله: ۹۱/۶/۱۲ - پذیرش مقاله: ۹۱/۸/۲۹)

چکیده

زمینه: افزایش شیوع استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) در جوامع مختلف به روشنی دیده می‌شود و این مسئله درمان بیماران مبتلا به عفونت‌های ناشی از این باکتری را با مشکلات جدی مواجه کرده است. بنابراین این بررسی با هدف مقایسه روش‌های فنوتیپی (روش دیسک دیفیوژن) و ژنوتیپی (روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) جهت تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) جدا شده از بیماران بیمارستان مرکزی شهر اراک انجام شده است.

مواد و روش‌ها: در این بررسی توصیفی مقطعی تعداد ۱۰۰ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس درمدت یکسال از بیماران بیمارستان مرکزی شهر اراک جداسازی و مورد آزمایش قرار گرفت. ابتدا حساسیت نمونه‌ها نسبت به دیسک سفوکسیتین و اگزاسیلین به روش دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار گرفت. سپس وجود ژن *mecA* در سویه‌های مذکور با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) ارزیابی شد و یافته‌ها از نظر حساسیت و ویژگی با هم و با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۵ و آزمون کای دو مقایسه گردید.

یافته‌ها: از ۱۰۰ نمونه جدا شده از بیماران، ۷۵ (۷۵ درصد) نمونه به روش اگزاسیلین دیسک دیفیوژن، نسبت به اگزاسیلین مقاوم بودند، اما در روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن، ۸۳ (۸۳ درصد) نمونه نسبت به سفوکسیتین مقاومت داشتند، که البته سه نمونه مقاوم بدون ژن *mecA* بودند، در روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، ۸۰ نمونه (۸۰ درصد) دارای ژن *mecA* گزارش شد. که به ترتیب دارای حساسیت و ویژگی ۹۳/۷۵، ۱۰۰، ۱۰۰ درصد و ۸۵، ۱۰۰ درصد بودند.

نتیجه‌گیری: یافته‌ها، بیانگر این است که روش اگزاسیلین دیسک دیفیوژن هرچند روشی فنوتیپی و ساده می‌باشد اما نسبت به روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) از حساسیت کمتری برخوردار است و جهت شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) روشی قابل اطمینان نمی‌باشد. همچنین وجود سویه‌هایی با مقاوم نسبت به سفوکسیتین بدون ژن *mecA* احتمالاً بیانگر بروز نوع دیگری از مقاومت و یا بروز نوعی موتاسیون در استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین می‌باشد.

واژگان کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، مقاومت به متی‌سیلین، دیسک دیفیوژن، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

* گروه میکروب‌شناسی و ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.



مقدمه

پس از آنکه پنی سیلین به عنوان نخستین آنتی بیوتیک ضد این باکتری ها شناخته شد، استافیلوکوکوس اورئوس به واسطه داشتن آنزیم پنی سلیناز که از راه پلاسمید منتقل می شود نسبت به این آنتی بیوتیک مقاومت آنزیمی پیدا کرد به گونه ای که امروزه کمتر از ۱۰ درصد استافیلوکوکوس اورئوس به این آنتی بیوتیک حساس می باشد (۷).

پس از افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به پنی سیلین، داروهای نیمه صناعی مقاوم به فعالیت های آنزیمی (مقاوم به هیدرولیز بتالاکتاماز) همچون نافسیلین، متی سیلین و آگراسیلین ساخته شد، اما پس از مدتی به این آنتی بیوتیک نیز مقاومت نشان داد. امروزه فقط ۳۰ تا ۵۰ درصد از استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی بیوتیک های مذکور حساسیت نشان می دهند (۳).

علت بروز این نوع مقاومت آنتی بیوتیکی حضور ژن کروموزومی (*mecA*) در این سویه ها می باشد، البته این مقاومت توسط ترادفی از ژن های موجود در ناحیه ای از کروموزوم استافیلوکوکوس اورئوس به نام کاست کروموزومی استافیلوکوکوی *mec* (*Scc mec*) کد می گردد. این کاست متشکل از سه قسمت *mecA*، *ccr* و *J.region* بوده که ژن *mecA* پروتئین متصل شونده پنی سیلین به نام PBP2a را کد می کند که این محصول باعث می شود که استافیلوکوکوس اورئوس افینیتی (*Affinity*) و تمایل کمی به آنتی بیوتیک های بتالاکتام داشته باشد و در نهایت سویه های MRSA را به وجود می آورد (۸).

نخستین بار در سال ۱۹۶۱ در انگلستان پس از بررسی

استافیلوکوکوس اورئوس باکتری گرم مثبت، کاتالاز مثبت، هوازی بی هوازی اختیاری و بدون اسپور می باشد که در بخش قدامی سوراخ بینی (شایع ترین مکان کلونیزاسیون)، پوست به ویژه پوست آسیب دیده، واژن، زیر بغل، ناحیه پرینه، ناف نوزادان تازه متولد شده و اوروفارنکس کلونیزه می شود (۱ و ۲).

استافیلوکوکوس اورئوس بعد از شریشیا کلی به عنوان دومین عامل ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی مطرح می باشد (۱ و ۳) به گونه ای که رتبه نخست را در ایجاد عفونت های زخم ایجاد شده در اثر جراحی دارد. همچنین دومین علت باکتری می اولیه بعد از استافیلوکوک های کوآگولاز منفی (*CONS*) بوده و شایع ترین علت اندوکاردیت (۲۵ الی ۳۵ درصد) در سراسر دنیا می باشد. این میکروارگانیسم اغلب باعث آبسه، عفونت های جریان خون، عفونت پس از جراحی، و گاهی مرگ و میر می گردد، تخمینی از پژوهش های موجود و داده های سرشماری نشان می دهد که ۱۷۰۰۰ مورد، مرگ و میر در سال ۲۰۰۸ به علت ابتلا به عفونت های ناشی از این باکتری رخ داده است (۴).

مهم ترین راه انتقال این باکتری به بیماران بستری شده در بیمارستان ها از طریق دست های آلوده پرسنل بهداشتی و درمانی است. استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین (*MRSA*) از پاتوژن های شایع بیمارستانی می باشد که طی سال های گذشته میزان شیوع آن ها در سرتاسر جهان در حال افزایش است و به عنوان یک اپیدمی جهانی شناخته می شود (۵ و ۶).

بروز مشکلاتی از قبیل افزایش میزان مرگ و میر، افزایش میزان جراحات وارده به بیماران بستری شده، افزایش هزینه‌های درمان شده است، لذا تشخیص سریع *استافیلوکوکوس اورئوس* های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) و درمان به‌موقع این باکتری جهت جلوگیری از انتشار سویه‌های مذکور از اهمیت به‌سزایی برخوردار می‌باشد (۱، ۳ و ۹).

هدف این بررسی با توجه به توصیه CLSI^۱ مبنی بر استفاده از دیسک سفوکسیتین به‌جای اگزاسیلین در روش دیسک دیفیوژن جهت تشخیص مقاومت نسبت به متی‌سیلین در *استافیلوکوکوس اورئوس* (۱۱)، مقایسه روش فنوتیپی (سفوکسیتین دیسک دیفیوژن و اگزاسیلین دیسک دیفیوژن) و روش ژنوتیپی (واکنش زنجیره‌ای پلیمرز PCR) جهت شناسایی روشی سریع و کارآمد برای ردیابی ژن *mecA* در نمونه‌های جداسازی شده از بیماران مختلف می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه که به‌صورت توصیفی-مقطعی صورت پذیرفته است تعداد ۱۰۰ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* (خون، سوختگی، مایع مغزی نخاعی، ادرار، مایع مفصلی و غیره) در فاصله زمانی تیرماه ۱۳۹۰ الی تیرماه ۱۳۹۱ از بیماران بستری شده با سنین متفاوت در بخش‌های مختلف بیمارستان مرکزی شهر اراک وابسته به دانشگاه علوم پزشکی اراک جمع‌آوری گردید. این امر پس از اخذ مجوز از کمیته اخلاق دانشگاه و رضایت‌نامه کتبی از بیماران صورت گرفت (که البته تمامی اطلاعات و داده‌های حاصله از نمونه‌های بیماران به‌صورت محرمانه باقی خواهد ماند). در ابتدا با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی

عفونت ایجاد شده توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* و مشخص شدن مقاومت این باکتری نسبت به درمان، سویه‌های (MRSA) تعریف شدند (۱ و ۹). امروزه تنها داروی انتخابی برای درمان عفونت‌های ناشی از این سویه‌ها ونکومايسين می‌باشد، البته بررسی‌های صورت گرفته نشان می‌دهد که سویه‌های مقاوم به ونکومايسين به‌واسطه کسب ژن (van) از انتروکوک‌ها و همچنین تغییر در ساختار دیواره این باکتری‌ها نیز در حال انتشار می‌باشند (۹).

پس از پژوهش‌های گسترده مشخص گردید که سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) از جمله عوامل ایجاد کننده عفونت‌های بسیار گسترده در سطح جامعه (MRSA CA) و سطح بیمارستان (HA MRSA) می‌باشد (۳، ۹ و ۱۰).

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) که ۷۲ ساعت بعد از پذیرش بیمار در بیمارستان از بیمار جدا می‌شوند، HA MRSA می‌گویند که البته این سویه‌ها حساسیت بیشتری به داروها دارند. سویه‌های HA MRSA دارای *mec Scc* تیپ‌های I، II و III می‌باشند. و همچنین CA MRSA در واقع به *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) اطلاق می‌شوند که از بیمارانی با سابقه حضور کمتر از ۴۸ تا ۷۲ ساعت در بیمارستان جدا شده باشند. و در مقابل این سویه دارای *mec Scc* تیپ‌های V و IV می‌باشند (۱).

یکی از مشکلات عمده در درمان و پیشگیری از عفونت‌های ایجاد شده توسط *استافیلوکوکوس اورئوس*، مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف می‌باشد که این امر موجب گسترش عفونت‌های ناشی از این باکتری و همچنین

¹ Clinical Laboratory Standard Institute

(رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، کوآگولاز اسلایدی، کوآگولاز لوله ای، تخمیر مانیتول (MSA) و نوکلئاز مقاوم به حرارت (DNase) سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* تعیین هویت گردیدند. سپس پرایمر ۱۰۸bp برای ژن sa442

5' F(AATCTTTGTCGGTACACGATATTCCTTCACG3'
5' R(CGTAATGAGATTTCAGTAGATAATACAACA3'

(۹) تمامی پرایمرها تهیه شده توسط شرکت ژن فن آوران تهران می باشند) که به عنوان مارکر تشخیصی ژنتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* می باشد، ساخته شد و نمونه ها با روش زنجیره ای پلیمرز (PCR) مورد بررسی قرار گرفته و به عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* تأیید شدند.

در ادامه جهت مشخص کردن *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین (MRSA) به روش فنوتیپی (حساسیت آنتی بیوتیکی)، تمامی نمونه ها به روش دیسک دیفیوژن مطابق با پروتکل (Clinical and Laboratory Standards Institute) CLSI 2012 و بر اساس قطر هاله دیسک ۳۰ میکروگرمی سفوکسیتین و دیسک ۱۰ میکروگرمی اگزاسیلین (تمامی دیسک ها از شرکت MAST انگلستان تهیه شده بودند) مورد بررسی قرار گرفتند.

بدین منظور نمونه ها با استفاده از سواب استریل در محیط مولر هیتون برات (تمامی محیط ها از شرکت Merck آلمان تهیه شده بودند) کشت داده شد، سپس محیط ها ۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. پس از رشد باکتری، کدورتی مطابق با کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند (۱/۵×۱۰^۸cfu/ml) آماده گردید و با استفاده از سواب استریل روی محیط مولر هیتون آگار کشت داده شد و سپس با پنس استریل دیسک های آنتی بیوتیکی به فاصله ۲۴ میلی متر از هم بر روی سطح

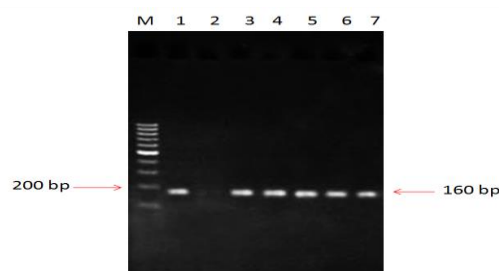
محیط مولر هیتون آگار قرار داده شد، محیط ها ۱۶ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. پس از سپری شدن این زمان نتایج حاصله خوانده شد. چنانچه قطر هاله ایجاد شده نسبت به دیسک اگزاسیلین بیشتر از ۲۱ میلی متر (<۲۱) و نسبت به دیسک سفوکسیتین (<۱۳) بیشتر از ۱۳ میلی متر بود، نمونه را به عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس به متی سیلین (MSSA)، و در صورتی که قطر هاله نسبت به دیسک اگزاسیلین کمتر از ۲۱ میلی متر (<۲۱) و نسبت به دیسک سفوکسیتین کمتر از ۱۳ میلی متر (<۱۳) بود، نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین (MRSA) در نظر گرفته شد. مقاومت نمونه های مورد نظر نسبت به سفوکسیتین و اگزاسیلین در واقع نشان دهنده مقاومت به آنتی بیوتیک های بتا لاکتام مانند پنی سیلین ها، متی سیلین، سفالوسپورین هاست (۱ و ۵).

در ادامه برای شناسایی ژن مقاومت به متی سیلین، ابتدا استخراج DNA سویه ها به وسیله کیت استخراج تهیه شده از کمپانی (Bioflux-bioer) کره جنوبی صورت پذیرفت و در پایان جهت ردیابی ژن *mec A* از پرایمرهای ۱۶۰bp ساخته شده

5' F(TCCAGATTACAACCTCACCAGG 3'
5' R(CCACTTCATATCTTGTAAACG 3'

(۹) (تهیه شده توسط شرکت ژن فن آوران تهران) استفاده گردید. تکثیر قطعه مورد نظر با استفاده از دستگاه با دمای دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه، سپس ۳۰ سیکل با دمای دناتوراسیون ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، annealing ۵۳ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه و extension ۷۲ درجه سانتی گراد یک دقیقه و extension نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه صورت پذیرفت.

با روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن، تعداد ۸۳ نمونه (۸۳ درصد) نسبت به سفوکسیتین مقاوم بودند که البته سه نمونه مقاوم فاقد ژن *mecA* بود، و ۱۷ نمونه نسبت به سفوکسیتین حساس بودند اما در بررسی انجام شده به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تعداد ۸۰ نمونه (۸۰ درصد) واجد ژن *mecA* بودند. اما با توجه به اینکه روش PCR از طرف CLSI به عنوان استاندارد طلایی شناسایی /استافیلوکوکوس /اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) معرفی شده است (۱۲ و ۱۳)، بنابراین نتایج حاصله از روش دیسک دیفیوژن با این روش مقایسه شد که به ترتیب دارای حساسیت و ویژگی ۹۳/۷۵، ۱۰۰، ۱۰۰ درصد و ۱۰۰، ۸۵ و ۱۰۰ درصد بودند (جدول ۲).



شکل (۱) تصویر ژل الکتروفورز ژن *mecA* حاوی باند ۱۶۰. (۱) چاهک M: مارکر (۲) چاهک ۱: کنترل مثبت (نمونه کنترل مثبت ۴۹۴۷۶: ATCC می‌باشد) (۳) چاهک ۲: نمونه فاقد *mecA* (۴) چاهک ۳: نمونه‌های *mecA* مثبت می‌باشند.

جدول ۲) توزیع فراوانی MRSA و مقایسه حساسیت و ویژگی روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی در نمونه‌های جدا شده از بیماران

| روش آزمایش | روش آزمایش | روش آزمایش | روش آزمایش | روش آزمایش | روش آزمایش | روش آزمایش |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| آزمایش آزمایش | آزمایش آزمایش | آزمایش آزمایش | آزمایش آزمایش | آزمایش آزمایش | آزمایش آزمایش | آزمایش آزمایش |
| اگزاسیلین | ۷۵ | ۹۳/۷۵ | ۱۰۰ | ۱۰۰ | ۸۰ | ۱۰۰ |
| دیسک دیفیوژن | ۸۳ | ۱۰۰ | ۸۵ | ۹۶/۳۹ | ۱۰۰ | ۱۰۰ |
| سفوکسیتین | ۸۰ | ۱۰۰ | ۱۰۰ | ۱۰۰ | ۱۰۰ | ۱۰۰ |
| دیسک دیفیوژن | PCR | | | | | |

مقادیر به کار رفته برای هر نمونه در حجم ۵۰ میکرولیتر به صورت زیر می‌باشد که ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده به عنوان الگو، ۱ میکرولیتر از پرایمر رفت، ۱ میکرولیتر از پرایمر برگشت (۱۰ پیکومول)، ۲۵ میکرولیتر از 2XTaq Master mix (vivantis) و ۲۱ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر استفاده گردید. بعد از اتمام واکنش PCR محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد رنگ شده با safe dye، با ولتاژ ۸۵ به مدت ۱ ساعت الکتروفورز شد. سپس ژل با استفاده از نور ماوراء بنفش مورد ارزیابی قرار گرفت. باندهای DNA به دست آمده به اندازه ۱۶۰ bp در مقایسه با (DNA size marker 100bp Fermentas) به عنوان قطعه مورد نظر از ژن در نظر گرفته شد و وجود سویه‌های MRSA تأیید گردید (شکل ۱). در این مطالعه از نمونه کنترل مثبت ۴۹۴۷۶: ATCC استفاده شد و در ادامه این تحقیق نتایج به دست آمده از ارزیابی مقاومت نمونه به متی‌سیلین به دو روش فنوتیپی (روش دیسک دیفیوژن) و ژنوتیپی (PCR) مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت. حساسیت و ویژگی هر روش با استفاده از نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc، Il.Chicago، USA) ویرایش ۱۵ و با استفاده از آزمون کای دو محاسبه گردید. ($P < 0.05$) به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد (۱۱).

یافته‌ها

از ۱۰۰ نمونه /استافیلوکوکوس /اورئوس جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان، تعداد ۷۵ نمونه (۷۵ درصد) به روش اگزاسیلین دیسک دیفیوژن، نسبت به اگزاسیلین مقاوم بوده و ۲۵ نمونه دارای حساسیت نسبت به اگزاسیلین بودند، در حالی که پس از بررسی

بحث

در بررسی پیش رو، به ارزیابی عملکرد روش فنوتیپی (اگزاسیلین دیسک دیفیوژن و سفوکسیتین دیسک دیفیوژن) و روش ژنوتیپی (واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) جهت تعیین ویژگی و حساسیت روش‌های فوق در مشخص کردن سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) پرداخته شد.

طی سالیان گذشته مؤسسه استاندارد CLSI تلاش‌های گسترده‌ای برای افزایش دقت و بهبود روش‌های به‌کار گرفته شده در شناسایی و تشخیص سویه‌های MRSA انجام داده است. تعیین سریع و دقیق وجود مقاومت نسبت به متی‌سیلین، کشف و ردیابی ژن *mec A* در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جهت شناسایی و درمان به‌موقع بیماران آلوده به این باکتری از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است و توجه به این مسئله می‌تواند گام بسیار مهمی در جهت پیش آگهی و کنترل عفونت‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* باشد (۲ و ۵).

با این حال گزارش‌های برجسته‌ای مبنی بر وجود خطا و اشتباه در شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) در روش‌های فنوتیپی وجود دارد. هم اکنون، روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) به‌عنوان استاندارد طلایی در جهت شناسایی ژن *mecA* از سوی CLSI (۲۰۱۲) معرفی شده است. (۹). بنابراین با توجه به بالا بودن هزینه‌های این روش و نیازمند بودن به کادر مجرب و همچنین عدم انجام آن به‌صورت معمول در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی، پژوهشگران بررسی‌های گسترده‌ای در زمینه شناسایی روشی ساده، کم هزینه و سریع جهت جایگزینی مناسب برای روش مذکور انجام داده‌اند.

تحقیق آناد (Anad) و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی ۵۰ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که از بین

۵۰ نمونه بررسی شده به‌روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن، ۳۲ نمونه نسبت به سفوکسیتین مقاوم بوده و همه ۳۲ نمونه پس از بررسی با روش PCR دارای ژن *mec A* بودند اما در روش اگزاسیلین دیسک دیفیوژن، ۲۸ نمونه نسبت به اگزاسیلین دارای مقاومت بودند (۱۴). در مطالعه نفیسی و همکاران در سال ۱۳۸۶ از بین ۵۲ *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده ۲۳ (۴۴ درصد) مورد به‌روش فنوتیپی نسبت اگزاسیلین مقاوم بودند در حالی که ۲۷ (۵۲ درصد) مورد از ۵۲ *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده واجد ژن *mecA* بودند (۱۵).

در مطالعه پرامودهنی (pramodhini) و همکاران در سال ۲۰۱۱، ۵۵ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* از آبسه‌های عمیق و سطحی جداسازی شد. در این بررسی ۲۰ (۳۶/۴ درصد) نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین با روش PCR شناسایی شد. اما در مقایسه با روش PCR و روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن که دارای ویژگی و حساسیت (۱۰۰ درصد) می‌باشند، روش اگزاسیلین دیسک دیفیوژن دارای ویژگی (۱۰۰ درصد) و حساسیت (۹۰ درصد) و همچنین دارای ویژگی می‌باشد.

تشخیص *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین به‌وسیله روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن و اگزاسیلین دیسک دیفیوژن ساده و نسبتاً ارزان است و می‌تواند به‌عنوان جایگزین برای روش PCR استفاده شود (۱۶).

علی‌قلی و همکاران ۱۶۰ (۴۷ درصد) سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* را از بیمارستان امام خمینی تهران جداسازی کرده و با روش فنوتیپی مقاوم به اگزاسیلین تشخیص دادند. در حالی که به‌روش PCR ۱۶۲ (۴۸ درصد) دارای ژن *mecA* بودند (۱۷).

در مطالعه سانکاک (Sancak) و همکاران در سال ۲۰۰۳ تعداد ۴۰۶ نمونه استافیلوکوک از بیماران بیمارستان حاجت تپه جداسازی شد که ۲۴۸ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس و ۱۵۸ نمونه استافیلوکوک کوآگولاز منفی بودند. در این بررسی روش دیسک دیفیوژن در مقایسه با PCR برای شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس دارای ویژگی و حساسیت ۱۰۰ درصد بود، اما برای استافیلوکوک کوآگولاز منفی دارای ویژگی (۷۹ درصد) و حساسیت (۱۰۰) بود. اگر چه روش دیسک دیفیوژن به عنوان روشی قابل اعتماد برای تشخیص مقاومت به متی‌سیلین در نمونه‌های استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد، اما نمی‌تواند همان موفقیت را در تشخیص استافیلوکوک کوآگولاز منفی داشته باشد (۱۸).

کاژمارک (Kaczmarek) و همکاران در سال ۲۰۰۶ مطالعه خود را بر روی ۱۲۰ نمونه جدا شده از بیماران بیمارستان تورو انجام دادند. در این تحقیق ۶۰ نمونه (۵۰ درصد) با روش PCR واجد ژن *mecA* بودند. اما روش اگزاسیلین دیسک دیفیوژن در مقایسه با PCR دارای ویژگی (۹۳/۳ درصد) و حساسیت (۹۵ درصد) بود و همچنین روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن دارای ویژگی (۱۰۰ درصد) و حساسیت (۹۶ درصد) بود. یافته‌ها نشان داد که روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن نسبت به اگزاسیلین دیسک دیفیوژن برای تشخیص MRSA روش مناسب‌تری می‌باشد (۱۹).

مطالعه ایراز (Iraz) و همکاران در سال ۲۰۱۲ با هدف مقایسه روش‌های مختلف فوتیپی: انتشار دیسک، غربالگری اگزاسیلین آگار، لاتکس آگلوتیناسیون و سیستم خودکار BD جهت تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) انجام شد. حضور ژن *mecA* از طریق PCR به عنوان نشانگر مثبت

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین مورد استفاده قرار گرفت. پس از آن، ۲۱۴ نمونه مقاوم به متی‌سیلین با روش اگزاسیلین دیسک دیفیوژن و سفوکسیتین دیسک دیفیوژن، غربالگری اگزاسیلین آگار، لاتکس آگلوتیناسیون و سیستم خودکار BD مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. که بر این اساس در تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن نسبت به روش اگزاسیلین دیسک دیفیوژن، روشی مفیدتر می‌باشد. اما به طور کلی روش سیستم خودکار BD موفق‌تر از سایر روش‌های فوتیپی بود (۲۰ و ۲۱).

نتیجه‌گیری

یافته‌ها نشان می‌دهد که روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن روشی نسبتاً کارآمد، کم هزینه و بسیار ساده است، توان انجام در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی به صورت معمول را دارد و جهت غربالگری اولیه برای شناسایی سویه‌های MRSA مناسب می‌باشد.

روش اگزاسیلین دیسک دیفیوژن با توجه به نتایج منفی کاذب نمی‌تواند روشی جایگزین برای روش ژنوتیپی جهت شناسایی سویه‌های MRSA باشد. اما با توجه به کم هزینه بودن انجام آزمایش می‌تواند برای غربالگری اولیه به کار گرفته شود، با این وجود که نیازمند آزمایشی تأییدی می‌باشد. از این رو، روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن در تشخیص MRSA، مفیدتر از روش اگزاسیلین دیسک دیفیوژن می‌باشد و به طور کلی روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) به عنوان استاندارد طلایی در جهت شناسایی ژن *mecA* از طرف CLSI معرفی شده است و به همراه سفوکسیتین دیسک دیفیوژن جهت شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین روش‌های قابل اعتمادی می‌باشند.

اورئوس نظیر ناحیه ژن *mec A* باشد که البته شناسایی آن از اهمیت به سزایی برخوردار خواهد بود. امید می رود که در مطالعات بعدی علت بروز چنین یافته هایی شناسایی گردد.

سپاس و قدردانی

بدین وسیله از همکاران بخش میکروب شناسی بیمارستان ولی عصر اراک به خصوص سرکار خانم مرضیه رنجبران و آقای مسعود صرافیان که ما را در انجام این طرح یاری نمودند تشکر و قدردانی به عمل می آید. از معاونت محترم آموزش دانشگاه به دلیل حمایت مالی این طرح نیز قدردانی می گردد.

اما مسئله ارزشمند در بررسی کنونی این است که با توجه به اینکه مؤسسه استاندارد CLSI روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن را برای شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین (MRSA) به عنوان روشی قابل اطمینان معرفی کرده است اما در این مطالعه با استفاده از روش مذکور سویه هایی از *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی شدند که دارای مقاومت نسبت به سفوکسیتین بودند اما پس از بررسی با روش PCR مشخص شد که فاقد ژن *mec A* می باشند. این یافته بیانگر نکته ای مبهم و مهم می باشد که آیا نتایج حاصل شده می تواند دلیلی بروز احتمالی نوعی مقاومت جدید و یا ایجاد نوعی موتاسیون در ژنوم *استافیلوکوکوس*

References:

1. Ghaznavi-Rad E, Nor Shamsudin M, Sekawi S, et al. Predominance and Emergence of Clones of Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Malaysia. JCM 2010; 48: 867-72.
2. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 505-20.
3. Graves SF, Kobayashi SD, DeLeo FR. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* immune evasion and virulence. J Mol Med 2010; 88: 109-14.
4. Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. JAMA 2007; 298: 1763-71.
5. Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J, et al. Emergence and resurgence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. Lancet 2006; 368: 874-85.
6. Emmerson AM, Enstone JE, Griffin M, et al. The second national prevalence survey of infection in hospitals-overview of the results. J Hosp Infect 1996; 32: 175-90.
7. Malachowa N, DeLeo FR. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. Cell Mol Life Sci 2010; 67: 3057-71.
8. Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 1984; 158: 513-6.
9. Ghaznavi-Rad E, Nor Shamsudin M, Sekawi Z, et al. A simplified multiplex PCR assay for fast and easy discrimination of globally distributed staphylococcal discrimination of globally distributed staphylococcal cassette chromosome *mec* types in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. JCM 2010; 59: 1135-9.
10. Morell EA, Balkin DM. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* A Pervasive Pathogen Highlights the need for new Antimicrobial development. Yale J Biol Med 2010; 83: 223-33.
11. Venkatakrishna R, Kishore B, Manohar K, et al. Detection of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*: Comparison of Disc diffusion and MIC with *mecA* gene detection by PCR. IJPBS 2011; 1: 518-21.
12. Siripornmongkolchai T, Chomvarin C, Chaicumpar K, et al. Evaluation of different primers for detecting *mecA* gene by PCR in comparison with phenotypic methods for discrimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2002; 33: 758-63.
13. Brown DF, Edwards DI, Hawkey PM, et al. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). J Antimicrob Chemother 2005; 56: 1000-18.
14. Anand KB, Agrawal P, Kumar S, et al.

- Comparison of cefoxitin disc diffusion test, oxacillin screen agar, and PCR for *mecA* gene for detection of MRSA. *Indian J Med Microbiol* 2009; 27: 27-9.
15. Kalhor H, Shariati L, Validi M, et al. Comparison of Agar screen and duplex-PCR methods in determination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from nasal carriage. *Afr J Microbiol Res* 2012; 6: 3722-6.
16. Pramodhini S, Thenmozhi Valli PR, Selvi R, et al. Comparison of Various Phenotypic Methods and *mecA* Based PCR for the Detection of MRSA. *J Clin Diagn Res* 2011; 5: 1359-62.
17. Hashemi F, Shahsavan Sh, Jebel Ameli F, et al, editors. The pattern of antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical sample in Imam Khomeini hospital of Tehran. *Proceedings of the 8th congress of microbiology, Iran. 2006; 22-24: 91.*
18. Sancak B, Ercis S, Haşcelik G. Comparison of the value of disk diffusion methods and polymerase chain reaction for fixation of methicillin resistant *staphylococcus*. *Mikrobiyol Bul* 2003; 37: 109-15.
19. Kaczmarek A, Budzyńska A, Mikołajczyk D, et al. Comparison of disk-diffusion method and PCR for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* strains. *Med Dosw Mikrobiol* 2006; 58: 87-93.
20. Iraz M, Tekerekoglu MS, Otlu B, et al. Comparison of an automated system with four phenotypic methods for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Afr J Microbiol Res* 2012; 6: 764-9.
21. Ghaznavi-Rad E, Amouzandeh-Nobaveh A. Comparison of molecular methods in epidemiological typing of methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. *ISMj*. In press 2012.

Original Article

Comparison of Disk Diffusion and "PCR" methods for determination of Methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) strains

M. Rezazadeh¹, R. Yousefi Mashouf², H. sarmadyan³,
E. Ghaznavi-Rad^{1,4*}

¹Department of Microbiology and immunology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, IRAN

²Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, IRAN

³Department of Infectious Diseases, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, IRAN

⁴Molecular research center, Arak University of Medical Sciences, Arak, IRAN

(Received 2 Sep, 2012 Accepted 19 Nov, 2012)

Abstract

Background: Increasing prevalence of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different communities is clearly visible. Because of this, treatment of patients with infections caused by those bacteria has fallen into critical troubles. Current study, therefore, is aimed to compare phenotypic (disk diffusion) and genotypic (PCR) methods for fast diagnosis of methicillin-resistant strains, isolated from patients of Arak Central Hospital.

Materials and Methods: In a cross sectional study within one year of period, a total of 100 samples were taken and tested from the patients of Arak hospital (located in the central part of Iran). Isolates' sensitivity to Cefoxitin Disk and Oxacillin was confirmed through disk diffusion. Using PCR, the isolates were tested for the presence of *mecA* gene. Results were compared from the points of sensitivity and specificity by application of chi square test in SPSS software.

Results: Seventy five (75%) out of the total 100 samples (through oxacillin disk diffusion method, already isolated from patients) were resistant to oxacillin. Meanwhile, 83(83%) of cefoxitin disk diffusion method samples were resistant to cefoxitin. Three resistant samples to cefoxitin were negative for *mecA* gene and 80 (80%) samples were positive for *mecA* gene using PCR. Sensitivity were respectively 93.75%, 100%, and specificity were 100% and 100%, 85%, 100%.

Conclusion: Findings indicate that oxacillin disk diffusion method is a simple phenotypic method, however, it has lower sensitivity compared to cefoxitin disk diffusion and polymerase chain reaction (PCR) methods. Therefore, it is not recommended for detection of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Existence of strains resistant to cefoxitin without *mecA* gene, shows the outset of another type of resistance or mutation in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Key words : *Staphylococcus aureus*, Methicillin resistant, disk diffusion, polymerase chain reaction

*Address for correspondence: Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences
email: e.ghaznavirad@arakmu.ac.ir.